

令和元年6月7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（特設分野研究）

研究期間：2016～2018

課題番号：16KT0177

研究課題名（和文）生体リズムによる多細胞体構築原理の理解

研究課題名（英文）Basic principles of biological rhythms during formation of multicellular structure

研究代表者

村本 哲哉（MURAMOTO, Tetsuya）

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：10612575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、約6分という同調的な遺伝子発現のリズムが観察された細胞性粘菌の多細胞体構築プロセスを観察対象として、生体リズムを制御する因子の動態解析や生体リズムの操作を実施した。転写因子の動的挙動に着目した結果、多細胞体構築プロセスで周期的な核局在化を繰り返す新たな転写因子を同定したほか、光刺激によりシグナル伝達経路の可逆的な操作を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子生物学の発展により多細胞体構築を制御する因子が同定され、その生体内での性質が明らかとなってきた。しかし、そのような因子が複雑に組み合わせたり、常に状態を変化させる動的空間において、正確な秩序形成がどのように生み出されているのかわかっていない。今回の成果は、短周期の生体リズムにより多細胞体が構築する仕組みや原理の理解につながると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we visualised dynamic nature of factors controlling the biological rhythms during the formation of multicellular structures in Dictyostelium cells that cycle on and off transcription in about 6 minutes. We identified a novel transcription factor that repeats cyclic nuclear localisation during multicellular formation and achieved reversible manipulation of the signal transduction pathway by light stimulation.

研究分野：発生生物学

キーワード：転写動態 イメージング 遺伝子発現振動 光操作

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの分子生物学や生化学の発展により、多細胞体構築を制御するさまざまな因子が同定され、生体内での性質が明らかになってきた。しかし、そのような因子が複雑に組み合わせたり、常に状態を変化させる動的空間において、多細胞体構築プロセスで見られる正確な秩序形成がどのようにして生み出されるのかわかっていない。我々はこれまで生細胞内で起こる遺伝子の転写がオン・オフを繰り返す様子を長時間可視化するシステムを構築することで、転写が不規則な間隔で活性化する転写バーストという現象をとらえてきた。この手法を用いて多細胞体構築過程で発現する遺伝子の転写を可視化すると、未分化状態で無秩序な振る舞いにみえる転写動態が、多細胞体構築プロセスでは同調的に約6分間隔でオン・オフを繰り返すことを見出した。遺伝子発現のリズムは、細胞周期、概日時計や体節形成過程を制御する分節遺伝子など、多くの生命現象で重要な役割を担っている。しかし、これらの生体リズムは、通常数時間から1日程度の周期性を示すが、我々はわずか6分程度のリズムを繰り返すという特徴的な生命現象を発見した。

## 2. 研究の目的

本研究では、この約6分という短周期の生体リズムが観察された細胞性粘菌の多細胞体構築プロセスを観察対象として、自発的な短周期の生体リズムを特徴とする多細胞体構築プロセスについて、その創生のしくみや原理を理解することを目指し、(1)生体リズムを制御する因子の動態解析、(2)タンパク質のリン酸化状態を可視化するプローブの開発、(3)生体リズムの操作、の3つに取り組み研究を展開した。

## 3. 研究の方法

### (1)生体リズムを制御する因子の動態解析

生体リズムを制御する因子の動態解析を行うため、転写因子に着目した。細胞性粘菌のゲノム中に存在する転写因子に緑色蛍光タンパク質(GFP)を融合させ、それを安定的に発現する細胞性粘菌株を作製した。この発現株が多細胞体構築する過程を可視化することで、その転写因子の局在と生体リズムの関係を調べた。

### (2)タンパク質のリン酸化状態を可視化するプローブの開発

周期的にリン酸化を受けるタンパク質としてプロテインキナーゼ(PKB)の基質タンパク質に着目し、リン酸化が入るとタンパク質の立体構造が変化し、蛍光輝度の変化として検出できるプローブの検討を行った。

### (3)生体リズムの操作

生体リズムを特徴とする多細胞体構築プロセスを理解するためには、周期的に情報を伝達するシグナル伝達経路を人為的にコントロールできる技術を確立することが重要である。そこで、光照射によりタンパク質を活性化できる光センサータンパク質を細胞内に組み込んだ株を作製した。

## 4. 研究成果

### (1)生体リズムを制御する因子の動態解析

ゲノム中に存在する155種類の転写因子にGFPを融合させた発現株を作製し、多細胞体構築過程での転写因子のイメージング解析を実施した。その結果、多細胞体構築過程を通して局在が核から核外もしくは核外から核へ変化したものや多細胞体構築の初期段階で同調的に約6分周期の核局在化を繰り返す新たな転写因子を発見した。この転写因子の周期的な局在変化は、未分化状態では観察されない一方、多細胞体構築プロセスの初期段階で長時間にわたって観察されており、周期的な転写活性化との関連が示唆される。この転写因子を生化学的に解析すると、シグナル刺激後1,2分でタンパク質の分子量の増加が観察された一方、約5分後には元の分子量へ戻るといった周期的な翻訳後修飾が観察された。そのため、周期的なリン酸化などシグナル伝達経路の活性化が関与していると考えている。また、この転写因子を破壊すると、多細胞体が異常な形態になる一方、遺伝子破壊株にこの転写因子を発現させることで異常な多細胞体が回復した。この転写因子のディリーション解析を行い、周期的な局在変化を示す領域を探索した。上流側を削った転写因子にGFPを融合し、多細胞体構築プロセスを観察したところ、周期的な核局在化が観察されたが、下流側を削った転写因子にGFPを融合したコンストラクトを導入した株では、恒常的に核局在化することがわかった。

### (2)タンパク質のリン酸化状態を可視化するプローブの開発

タンパク質のリン酸化状態を可視化するため、多細胞体構築過程でのリン酸化タンパク質の

動態解析を実施した。その結果、リン酸化が恒常的なタンパク質、リン酸化が増加するタンパク質、リン酸化が減少するタンパク質をリン酸化抗体により同定できた。このうちのいくつかについては、リン酸化を触媒するタンパクキナーゼも明らかにした。そこで、PKBの基質タンパクをターゲットとして選定し、リン酸化されると蛍光タンパク質の立体構造が変化し、蛍光輝度が増減するプローブの開発を進めた。リンカーの長さや膜局在化を促進する配列の挿入など複数のコンストラクトを試したが、シグナル刺激後の蛍光輝度の変化はわずか数%しか観察されず、生細胞内でモニター可能な効率的なプローブの開発には至らなかった。

### (3)生体リズムの操作

周期的に活性化するシグナル伝達経路を人為的にコントロールするため、光操作によりタンパク質を活性化できる光センサータンパク質を細胞内に組み込んだ株を作製した。光刺激により可逆的な操作が実現できているかどうかは、そのシグナル伝達経路を可視化するためのバイオセンサーを同時に細胞内に組み込むことで評価した。その結果、細胞に光刺激を行うことでシグナル伝達経路が活性化したことがバイオセンサーをモニターすることで示された。これまでに、約6分周期の同調的な転写のオン・オフをとらえてきたが、この光操作ツールは、数分周期の可逆的なシグナル伝達経路の操作が可能であることもわかった。次に、任意の領域に多細胞体構築を行わせるため光刺激を行ったところ、指定した場所で多細胞体構築を行えることができた。さらに、光刺激の頻度、強度、持続時間などを変えることで、多細胞体構築過程で見られる素過程に変調を起こすことに成功した。これらの結果は、短周期の生体リズムにより多細胞体が構築する仕組みや原理の理解につながると期待される。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Muramoto, T., Iriki, H., Watanabe, J., Kawata, T., Recent Advances in CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Dictyostelium. *Cells*, 査読有, 8, 2019, 46, doi: 10.3390/cells8010046.
2. Miyagawa, T., Koteishi, H., Kamimura, Y., Miyanaga, Y., Takeshita, K., Nakagawa, A., Ueda, M., Structural basis of Gip1 for cytosolic sequestration of G protein in wide-range chemotaxis. *Nat Commun*, 査読有, 9, 2018, 4635, doi: 10.1038/s41467-018-07035-x.
3. Miyanaga, Y., Kamimura, Y., Kuwayama, H., Devreotes, P.N., Ueda, M., Chemoattractant receptors activate, recruit and capture G proteins for wide range chemotaxis. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 507, 2018, 304-310, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.029.
4. Sekine, R., Kawata, T., Muramoto, T., CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes in Dictyostelium. *Sci Rep*, 査読有, 8, 2018, 8471, doi: 10.1038/s41598-018-26756-z.
5. Tanabe, Y., Kamimura, Y., Ueda, M., Parallel signaling pathways regulate excitable dynamics differently to mediate pseudopod formation during eukaryotic chemotaxis. *J Cell Sci*, 査読有, 131, 2018, doi: 10.1242/jcs.214775.
6. 宮永 之寛, 上村 陽一郎, 上田 昌宏, 三量体Gタンパク質の局在制御を介した走化性レンジの拡張機構. *生物物理*, 査読無, 58, 2018, 237-240, doi: 10.2142/biophys.58.237.

[学会発表](計43件)

1. Yoichiro Kamimura, Gip1 structure reveals the molecular mechanism of trimeric G protein shuttling for eukaryotic broad range chemotaxis, Gordon research conference, "directed Cell Migration", 2019
2. 上村陽一郎, 桑山秀一, 上田昌宏, 細胞性粘菌リソースと研究への利用, 第13回日本ゲノム微生物学会年会, 2019
3. 上村陽一郎, ユニークな生活環を持つ真核生物「細胞性粘菌」のモデル生物としての研究の魅力, 帝京大学バイオ・航空合同セミナープログラム, 2019

4. 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏、細胞性粘菌リソースと研究への利用、日本農芸化学会 2019 年度大会、2019
5. Yoichiro Kamimura, Hidekazu Kuwayama, Masahiro Ueda、National BioResource Project (NBRP) of cellular slime molds in Japan、Annual International Dictyostelium Conference 2018、2018
6. Yoichiro Kamimura, Takero Miyagawa, Yasuhiro Koteishi, and Masahiro Ueda、Structural basis of Gip1-mediated G protein shuttling which regulates broad dynamic range chemotaxis、Annual International Dictyostelium Conference 2018、2018
7. Tetsuya Muramoto、CRISPR/Cas9 mediated targeting of multiple genes、Annual International Dictyostelium Conference 2018、2018
8. 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏、細胞性粘菌リソースと研究への利用、シンポジウム「植物系 NBRP リソースとその活用研究最前線」、日本植物学会第 82 回大会、2018
9. 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏、NBRP「細胞性粘菌」: 多様な研究分野におけるモデル生物としての可能性、実物つきパネル展示「バイオリソース勢揃い」、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
10. 上村陽一郎、宮川武朗、小手石泰康、上田昌宏、GPCR シグナル伝達系における三量体 G タンパク質シャットリングの分子機構、第 41 回日本分子生物学会年会、2018
11. 上村陽一郎、走化性における勾配認識機構、第 52 回つくば藻類プロテISTフォーラム、2018
12. 熊倉あこや、菊地亜紀、村本哲哉、JmjC ドメインをもつタンパクが与える cAMP 伝達経路への影響、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
13. 上村陽一郎、NBRP 細胞性粘菌事業とその利用、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
14. 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏、NBRP 細胞性粘菌の利用法、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
15. 村本哲哉、遺伝子機能解析法 ~ 相同組換えからゲノム編集まで ~、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
16. 渡邊淳、関根僚也、村本哲哉、CRISPR を用いた全遺伝子破壊コンストラクトの構築、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
17. 入来星衣、伊藤美緒、村本哲哉、オフターゲット低減と変異検出の簡便化を目指した Cas9 Nickase の利用、第 8 回日本細胞性粘菌学会例会、2018
18. 上村陽一郎、桑山秀一、上田昌宏、ユニークな生活環を持つ真核生物「細胞性粘菌」のモデル生物としての研究の魅力、第 91 回日本細菌学会、2018
19. Yoichiro Kamimura, Hidekazu Kuwayama, Masahiro Ueda、National BioResource Project (NBRP) of cellular slime molds in Japan、Annual International Dictyostelium Conference 2017、2017
20. Yoichiro Kamimura, Takero Miyagawa, Yasuhiro Koteishi, and Masahiro Ueda、Structure understanding of Gip1-dependent trimeric G-protein shuttling for eukaryotic chemotaxis、Gordon research conference, "directed Cell Migration"、2017
21. 上村陽一郎、Heterotrimeric G-protein shuttling via Gip1 extends the dynamic range of eukaryotic chemotaxis.、RIKEN CLST Educational Program、2017
22. 上村陽一郎、宮川武朗、小手石泰康、上田昌宏、Gip1 の構造から見えてきた三量体 G タンパク質シャットリングの分子基盤、第 14 回 GPCR 研究会、2017

23. 関根僚也、**村本哲哉**、CRISPR/Cas9 による複数遺伝子の同時改変、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
24. 菊地亜紀、熊倉あこや、**村本哲哉**、1 細胞レベルでみるエピジェネティックな継承の解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
25. **上村陽一郎**、宮川武朗、小手石泰康、宮永之寛、上田昌宏、GPCR シグナル伝達系における三量体 G タンパク質シャトリングの分子機構、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
26. **上村陽一郎**、桑山秀一、上田昌宏、モデル真核生物「細胞性粘菌」の様々な研究における有用性と活用、第 40 回日本分子生物学会年会、2017
27. **村本哲哉**、1 細胞レベルでみられる転写動態の多様性と秩序形成、第 4 回北陸エピジェネティクス研究会、2017
28. 菊地亜紀、熊倉あこや、渡邊淳、**村本哲哉**、転写の安定化が及ぼす多細胞体形成への影響、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
29. **上村陽一郎**、宮川武朗、小手石泰康、宮永之寛、上田昌宏、三量体 G タンパク質の空間制御を可能にする構造基盤、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
30. **上村陽一郎**、桑山秀一、上田昌宏、第 4 期 NBRP 細胞性粘菌、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
31. **上村陽一郎**、桑山秀一、上田昌宏、もっと使える NBRP、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
32. 清水祐季、菊地亜紀、平岡真奈、**村本哲哉**、転写因子 GtaC により律動的な転写動態を示す遺伝子の解析、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
33. 船江聡子、岡野由里、渡邊淳、**村本哲哉**、周期的挙動を示す MYB 転写因子のライブイメージング解析、第 7 回日本細胞性粘菌学会例会、2017
34. **上村陽一郎**、走化性シグナル伝達における三量体 G タンパク質シャトリングを介した制御機構の研究、長崎大学医学部共同利用研究センターセミナー、2017
35. **上村陽一郎**、走化性の応答レンジを調節する三量体 G タンパク質のシャトリング制御、FBS コロキウム、2016
36. 嵯峨幸夏、橘高昂平、田向沙樹、栗原直也、島田奈央、**村本哲哉**、川田健文、細胞性粘菌 lncRNA の動態解析、RNA Frontier Meeting 2016、2016
37. 岡野由里、船江聡子、**村本哲哉**、周期的な局在変化を示す転写因子の細胞内動態解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
38. 菊地亜紀、清水祐季、**村本哲哉**、発生分化における短周期発現振動を示す遺伝子群の同定とその解析、第 39 回日本分子生物学会年会、2016
39. 岡野由里、船江聡子、川田健文、**村本哲哉**、転写因子の細胞内動態解析による多細胞体構築機構の解明、第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016
40. 関根僚也、**村本哲哉**、細胞性粘菌での CRISPR/Cas システムの利用、第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016
41. 菊地亜紀、**村本哲哉**、転写ダイナミックスの世代を超えた継承の解明、第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016
42. 清水祐季、菊地亜紀、平岡真奈、**村本哲哉**、発生分化における短周期発現振動を示す遺伝子の探索と解析、第 6 回日本細胞性粘菌学会例会、2016
43. **上村陽一郎**、上田昌宏、The molecular basis of heterotrimeric G-protein shuttling、日本細胞性粘菌学会第 6 回例会、2016

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：上村 陽一郎

ローマ字氏名：( KAMIMURA, Yoichiro )

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：上級研究員

研究者番号 ( 8 桁 ): 20321599

### (2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。